Gélose sélective GVPC pour *Legionella*

DOMAINE D'UTILISATION

La gélose sélective GVPC pour *Legionella* est destinée au dénombrement, à l'isolement et à la culture des espèces de *Legionella* dans les eaux et les autres prélèvements susceptibles d'en contenir.

HISTORIQUE

En 1977, MacDade *et al.* furent les premiers à isoler l'agent responsable de la maladie des Légionnaires, une bactérie maintenant appelée *Legionella pneumophila*. Après cette découverte, de nombreuses *Legionella* ont été trouvées dans des environnements aquatiques d'eau douce : circuits de distribution d'eau, systèmes de climatisation, tours de refroidissement, eaux thermales. On dénombre actuellement 43 espèces de *Legionella*.
En 1978, Weaver réussit à cultiver des *Legionella* sur une gélose Mueller-Hinton chocolat. Feeley *et al.* en déduisirent que la cystéine et le pyrophosphate ferrique pouvaient remplacer les suppléments vitaminés et l'hémoglobine présents dans la gélose Mueller-Hinton chocolat. Leurs travaux aboutirent à la formulation d'un milieu appelé F-G Agar. Ils déterminèrent également qu'une atmosphère enrichie à 2,5% en CO_2 était nécessaire à la culture des *Legionella*. En 1979, Feeley *et al.* modifièrent le milieu F-G en remplaçant l'hydrolysat de caséine par de l'extrait autolytique de levure, en ajoutant du charbon actif et en y supprimant l'amidon. Le milieu CYE obtenu permettait une meilleure croissance des *Legionella*. En 1980, Pasculle *et al.* ont supplémenté le milieu CYE avec un tampon ACES. Ils démontrèrent que ce milieu, dénommé BCYE, présentait une meilleure récupération des *Legionella* et pouvait être incubé en aérobiose. En 1981, Edelstein a augmenté la sensibilité du milieu en ajoutant de l'α-cétoglutarate (milieu BCYEα) et Wadowsky et Yee suggérèrent d'incorporer de la glycine, de la vancomycine et de la polymyxine B (milieu GVP) pour obtenir un milieu sélectif. En 1984, Dennis *et al.* formulèrent le milieu GVPC en ajoutant du cycloheximide dans le milieu GVP. Ils montrèrent que le milieu sélectif finalement obtenu, permettait d'augmenter le taux d'isolement des *Legionella*.

PRINCIPES

- L'extrait autolytique de levure constitue le substrat nutritif permettant la croissance des *Legionella.*
- Le charbon actif décompose le peroxyde d'hydrogène (production toxique du métabolisme), capture le dioxyde de carbone et modifie la tension superficielle.
- Le maintien du pH est assuré par le tampon ACES/KOH. Sa présence permet d'incuber les milieux en aérobiose.
- La cystéine et le pyrophosphate ferrique représentent des éléments nutritifs indispensables pour la culture des *Legionella.*
- L'α-cétoglutarate est un activateur de la croissance des *Legionella*.
- La microflore secondaire est inhibée par l'association entre la glycine, la vancomycine, la polymyxine B et le cycloheximide.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

MODE D'EMPLOI

- Préparer l'échantillon d'eau selon les indications décrites dans la norme en usage.
- Etaler 0,1 à 0,5 mL de l'échantillon à analyser ou déposer la membrane de filtration sur une boîte de milieu.
- Incuber à (36 ± 1)°C pendant 10 jours.
- Au cours de la période d'incubation, examiner les boîtes à partir du troisième jour et à trois reprises au moins à des intervalles de 2 à 4 jours.
- Noter le nombre de chaque type de colonies.
- Sélectionner au moins trois colonies caractéristiques de *Legionella* sur chacune des boîtes de milieu.
- Repiquer chaque colonie sur une boîte de milieu BCYEα sans cystéine (BCYEα - cys ; BM073) et une boîte de milieu BCYEα (BM072) du coffret BT007.
- Incuber à (36 ± 1)°C pendant au moins 2 jours.
- Considérer comme *Legionella* toutes les colonies qui se développent sur le milieu BCYEα mais ne cultivent pas sur le milieu BCYEα - cys.
- Identifier les espèces de *Legionella* par sérologie.

LECTURE

Les colonies de *Legionella* sp. ont une coloration blanche à grise. Elles peuvent également être bleues, roses, pourpres, marrons, vert jaune ou rouge foncé et devenir blanchâtres et/ou filamenteuses en vieillissant. Elles peuvent présenter un aspect de verre pilé à la loupe binoculaire. Certaines colonies présentent une fluorescence d'un blanc brillant sous lampe de Wood.

NOTA :

Les colonies de *Legionella* qui se développent sur des membranes filtrantes blanches ont un aspect différent de celles qui se développent sur un fond noir.

FORMULE - TYPE

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait autolytique de levure ..... 10,0 g
- Charbon actif ..... 2,0 g
- α-cétoglutarate, sel monopotassique ..... 1,0 g
- ACES (2-[2-amino-oxoéthyl)-amino] éthanesulfonique) ..... 10,0 g
- Hydroxyde de potassium ..... 2,8 g
- L-cystéine, chlorhydrate ..... 0,4 g
- Pyrophosphate ferrique ..... 0,25 g
- Glycine ..... 3,0 g
- Vancomycine ..... 1,0 mg
- Polymyxine B ..... 80000 UI
- Cycloheximide ..... 80,0 mg
- Agar agar bactériologique ..... 12,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 6,9 ± 0,1.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

CONTRÔLE QUALITE

- Milieu préparé en boîtes : gélose noire, avec particules de charbon actif.
- Réponse culturale typique après 5 jours d'incubation à 36°C :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité)
Legionella pneumophila	ATCC® 33152	66% ≤ R_2 ≤150%
Pseudomonas putida	ATCC 12633	inhibée
Escherichia coli	RIVM WR1	inhibée
Enterococcus faecalis	CCM 2541	inhibée

STOCKAGE / CONSERVATION

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri :
- Stocker entre 2 et 8°C, à l'abri de la lumière.
- La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

PRESENTATION

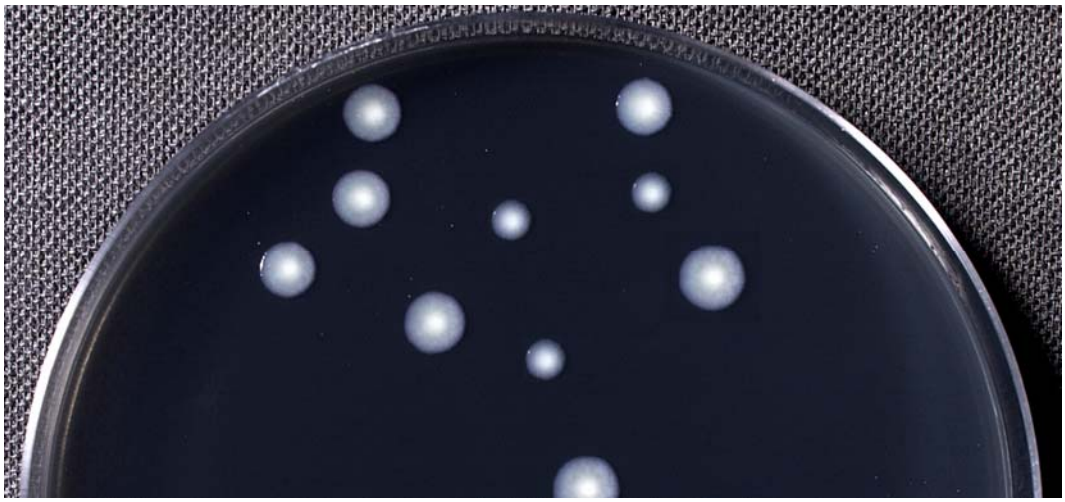
Code

Gélose GVPC pré-coulée en boîtes de Petri (Ø 90 mm) :
- Coffret de 20 boîtes — BM07108

SUPPORT PHOTO

Référence : BM07108

Utilisation : Dénombrement et isolement des *Legionella* principalement dans les eaux.



Legionella pneumophila

Gélose sélective GVPC pour *Legionella*
Réf : **BM07108**
Incubation : jusqu'au 10 jours / 36°C
Caractéristiques : colonies blanches à grises avec une surface lisse ; les colonies présentent parfois un aspect de verre pilé à la loupe binoculaire.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

McDADE, J.E., SHEPARD, C.C., FASER, D.W. et al.. 1977. Legionnaires' disease : isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. New England Journal of Medicine, **297** : 1197-1203.

FEELEY, J.C., GORMAN, G.W., WEAVER, R.E., MACKEL, D.C. and SMITH, H.W.. 1978. Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. Journal of Clinical Microbiology, **8** : 320-325.

WEAVER, R.E. and FEELEY, J.C. 1979. Cultural and biochemical characterization of Legionnaires' disease bacterium. In Legionnaires', the Disease, the Bacterium, and Methodology. Centers for Disease Control, Atlanta, GA. pp 20-25.

FEELEY, J.C., GIBSON, R.J., GORMAN, G.W., LANGFORD, N.C., RASHEED, J.K., MACKEL, D.C. and BAINE, W.B.. 1979. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. Journal of Clinical Microbiology, **10** : 437-441.

PASCULLE, A.W., FEELEY, J.C., GIBSON, R.J., CORDES, L.G., MYEROWITZ, R.L., PATTON, C.M., GORMAN, G.W., CARMACK, C.L., EZZELL, J.W. and DOWLING, J.N.. 1980. Pittsburgh pneumonia agent: direct isolation from human lung tissue. Journal of Infectious Diseases, **141** : 727-732.

EDELSTEIN, P.H.. 1981. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. Journal of Clinical Microbiology, **14** : 298-303.

WADOWSKY, R.M. and YEE, R.B.. 1981. Glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens. Applied and Environmental Microbiology, **42** : 768-772.

DENNIS, P.J.L., BARTLETT, C.L.R. and WRIGHT, A.E.. 1984. Comparison of isolation methods for *Legionella* spp. In Thornsbury, C. *et al*. (ed.) Legionella : Proceedings of the 2nd International symposium Washington D.C. American Society for Microbiology, p 294-296.

ISO 11731. Mai 1998. Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement des *Legionella*.

Journal Officiel du 31 décembre 2004. Arrêté du 13 décembre 2004 relatif aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air soumises à autorisation au titre de la rubrique n° 2921.

NF T 90-461. Juillet 2001 et NF T 90-461/A1. Juin 2005. Qualité de l'eau. Microbiologie. Contrôle qualité des milieux de culture.

NF T 90-431. Septembre 2003 et NF T 90-431/A1. Avril 2006. Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement de *Legionella spp* et de *Legionella pneumophila*. Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation.

FD T 90-522. Juillet 2006. Qualité de l'eau. Guide technique de prélèvement pour la recherche de *Legionella* dans les eaux.

NF EN ISO 11731-2 (T 90-430). Juillet 2008. Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement des *Legionella*. Patrie 2 : Méthode par filtration directe sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries.

Les mentions portées sur l'étiquette sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document.
Les informations et les spécifications contenues dans cette fiche technique ont été établies à la date du 2009-02-10.
Elles sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.
Code document : BM071/F/2004-04 : 6.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr